

日本国特許庁
PATENT OFFICE
JAPANESE GOVERNMENT

25.05.00

REC'D 26 JUN 2000

WIPO

PCT

別紙添付の書類は下記の出願書類の謄本に相違ないことを証明する。
This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed
with this Office.

JP00/03372

出願年月日
Date of Application:

2000年3月30日

出願番号
Application Number:

PCT/JP00/02045

出願人
Applicant (s):

工業技術院長が代表する日本国
丸山明彦
北村恵子
倉根隆一郎

EJ4

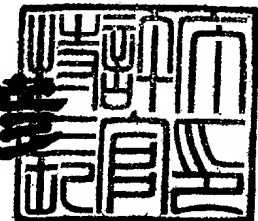
PRIORITY
DOCUMENT

SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

2000年6月9日

特許庁長官
Commissioner,
Patent Office

近藤隆彦



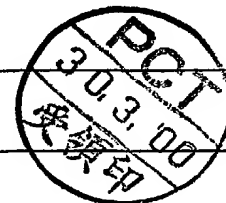
出証平 12-500099

特許協力条約に基づく国際出願願書

PH-909-PCT

原本（出願用） - 印刷日時 2000年03月30日（30.03.2000）木曜日 16時11分46秒

0	受理官庁記入欄	
0-1	国際出願番号.	
0-2	国際出願日	
0-3	(受付印)	
0-4	様式-PCT/R0/101 この特許協力条約に基づく国際出願願書は、 右記によって作成された。	PCT-EASY Version 2.90 (updated 08.03.2000)
0-5	申立て 出願人は、この国際出願が特許協力条約に従って処理されることを請求する。	
0-6	出願人によって指定された受理官庁	日本国特許庁 (R0/JP)
0-7	出願人又は代理人の書類記号	PH-909-PCT
1	発明の名称	新規低温細菌を検出するためのDNAプローブ
11	出願人	出願人である (applicant only)
11-1	この欄に記載した者は	米国を除くすべての指定国 (all designated States except US)
11-2	右の指定国についての出願人である。	工業技術院長が代表する日本国
11-4ja	名称	JAPAN as represented by SECRETARY OF AGENCY OF INDUSTRIAL SCIENCE AND TECHNOLOGY
11-4en	Name	100-8921 日本国
11-5ja	あて名:	東京都 千代田区
11-5en	Address:	霞が関一丁目3番1号 3-1, Kasumigaseki 1-chome Chiyoda-ku, Tokyo 100-8921 Japan
11-6	国籍 (国名)	日本国 JP
11-7	住所 (国名)	日本国 JP
11-8	電話番号	0298-61-2175
11-9	ファクシミリ番号	0298-61-2174



特許協力条約に基づく国際出願願書

原本(出願用) - 印刷日時 2000年03月30日 (30.03.2000) 木曜日 16時11分46秒

III-1 III-1-1	その他の出願人又は発明者 この欄に記載した者は	出願人及び発明者である (applicant and inventor) 米国のみ (US only)
III-1-2	右の指定国についての出願人である。	
III-1-4ja	氏名(姓名)	丸山 明彦
III-1-4en	Name (LAST, First)	MARUYAMA, Akihiko
III-1-5ja	あて名:	305-0031 日本国 茨城県 つくば市 吾妻2-817-2
III-1-5en	Address:	2-817-2, Azuma Tsukuba-shi, Ibaraki 305-0031 Japan
III-1-6	国籍(国名)	日本国 JP
III-1-7	住所(国名)	日本国 JP
III-2 III-2-1	その他の出願人又は発明者 この欄に記載した者は	出願人及び発明者である (applicant and inventor) 米国のみ (US only)
III-2-2	右の指定国についての出願人である。	
III-2-4ja	氏名(姓名)	北村 恵子
III-2-4en	Name (LAST, First)	KITAMURA, Keiko
III-2-5ja	あて名:	305-0061 日本国 茨城県 つくば市 稲荷前24-33
III-2-5en	Address:	24-33, Inarimae Tsukuba-shi, Ibaraki 305-0061 Japan
III-2-6	国籍(国名)	日本国 JP
III-2-7	住所(国名)	日本国 JP
III-3 III-3-1	その他の出願人又は発明者 この欄に記載した者は	出願人及び発明者である (applicant and inventor) 米国のみ (US only)
III-3-2	右の指定国についての出願人である。	
III-3-4ja	氏名(姓名)	倉根 隆一郎
III-3-4en	Name (LAST, First)	KURANE, Ryuichiro
III-3-5ja	あて名:	270-0031 日本国 千葉県 松戸市 新松戸7-253
III-3-5en	Address:	7-253, Shinmatsudo Matsudo-shi, Chiba 270-0031 Japan
III-3-6	国籍(国名)	日本国 JP
III-3-7	住所(国名)	日本国 JP

特許協力条約に基づく国際出願願書

原本(出願用) - 印刷日時 2000年03月30日 (30.03.2000) 木曜日 16時11分46秒

IV-1	代理人又は共通の代表者、通知のあて名 下記の者は国際機関において右記のごとく出願人のために行動する。	代理人 (agent)
IV-1-1ja	氏名(姓名)	平木 祐輔
IV-1-1en	Name (LAST, First)	HIRAKI, Yusuke
IV-1-2ja	あて名:	105-0001 日本国 東京都 港区 虎ノ門一丁目17番1号 虎ノ門5森ビル 3F
IV-1-2en	Address:	Toranomon No.5 Mori Building Third Floor, 17-1, Toranomon 1-chome Minato-ku, Tokyo 105-0001 Japan
IV-1-3	電話番号	03-3503-8637
IV-1-4	ファクシミリ番号	03-3503-0414
IV-2	その他の代理人	筆頭代理人と同じあて名を有する代理人 (additional agent(s) with same address as first named agent)
IV-2-1ja	氏名	石井 貞次
IV-2-1en	Name(s)	ISHII, Sadaji
V	国の指定	
V-1	広域特許 (他の種類の保護又は取扱いを求める場合には括弧内に記載する。)	EP: AT BE CH&LI CY DE DK ES FI FR GB GR IE IT LU MC NL PT SE 及びヨーロッパ特許条約と特許協力条約の締約国である他の国
V-2	国内特許 (他の種類の保護又は取扱いを求める場合には括弧内に記載する。)	AU CA JP NO NZ US
V-5	指定の確認の宣言 出願人は、上記の指定に加えて、規則4.9(b)の規定に基づき、特許協力条約のもとで認められる他の全ての国の指定を行う。ただし、V-6欄に示した国の指定を除く。出願人は、これらの追加される指定が確認を条件としていること、並びに優先日から15月が経過する前にその確認がなされない指定は、この期間の経過時に、出願人によって取り下げられたものとみなされることを宣言する。	
V-6	指定の確認から除かれる国	なし (NONE)
VI-1	先の国内出願に基づく優先権主張	
VI-1-1	先の出願日	1999年05月25日 (25.05.1999)
VI-1-2	先の出願番号	特願平11-145342号
VI-1-3	国名	日本国 JP
VI-2	優先権証明書送付の請求 上記の先の出願のうち、右記の番号のものについては、出願書類の認証謄本を作成し国際事務局へ送付することを、受理官庁に対して請求している。	VI-1
VII-1	特定された国際調査機関(ISA)	日本国特許庁 (ISA/JP)

特許協力条約に基づく国際出願願書

原本(出願用) - 印刷日時 2000年03月30日 (30.03.2000) 木曜日 16時11分46秒

		用紙の枚数	添付された電子データ
VIII	照合欄		
VIII-1	願書	5	-
VIII-2	明細書(配列表を除く)	16	-
VIII-3	請求の範囲	1	-
VIII-4	要約	1	abst.909.txt
VIII-5	図面	0	-
VIII-6	明細書の配列表	5	-
VIII-7	合計	28	
添付書類		添付	添付された電子データ
VIII-8	手数料計算用紙	✓	-
VIII-14	寄託した微生物又は生物材料に関する書面	✓	-
VIII-15	計算機読取可能な媒体によるマルチメディア及び/又はアミノ酸配列リスト		別個のフレキシブルディスク
VIII-16	PCT-EASYディスク	-	フレキシブルディスク
VIII-17	その他	納付する手数料に相当する特許印紙を貼付した書面	-
VIII-17	その他	国際事務局の口座への振込を証明する書面	-
VIII-17	その他	陳述書	-
VIII-17	その他	フレキシブルディスクの記録形式等の情報を記載した書面	-
VIII-18	要約書とともに提示する図の番号		
VIII-19	国際出願の使用言語名:	日本語 (Japanese)	
IX-1	提出者の記名押印		
IX-1-1	氏名(姓名)	平木 祐輔	
IX-2	提出者の記名押印		
IX-2-1	氏名(姓名)	石井 貞次	

受理官庁記入欄

10-1	国際出願として提出された書類の実際の受理の日	
10-2	図面:	
10-2-1	受理された	
10-2-2	不足図面がある	
10-3	国際出願として提出された書類を補完する書類又は図面であってその後期間内に提出されたものの実際の受理の日(訂正日)	
10-4	特許協力条約第11条(2)に基づく必要な補完の期間内の受理の日	
10-5	出願人により特定された国際調査機関	ISA/JP

特許協力条約に基づく国際出願願書

原本（出願用） - 印刷日時 2000年03月30日（30.03.2000）木曜日 16時11分46秒

10-6	調査手数料未払いにつき、国際調査機関に調査用写しを送付していない	
------	----------------------------------	--

国際事務局記入欄

11-1	記録原本の受理の日	
------	-----------	--

PCT手数料計算用紙(願書付属書)

PH-909-PCT

原本(出願用) - 印刷日時 2000年03月30日 (30.03.2000) 木曜日 16時11分46秒

[この用紙は、国際出願の一部を構成せず、国際出願の用紙の枚数に算入しない]

0	受理官庁記入欄	
0-1	国際出願番号.	
0-2	受理官庁の日付印	
0-4	様式-PCT/R0/101 (付属書)	
0-4-1	このPCT手数料計算用紙は、 右記によって作成された。	PCT-EASY Version 2.90 (updated 08.03.2000)
0-9	出願人又は代理人の書類記号	PH-909-PCT
2	出願人	工業技術院長が代表する日本国
12	所定の手数料の計算	金額/係数 小計 (JPY)
12-1	送付手数料 T	⇒ 18,000
12-2	調査手数料 S	⇒ 77,000
12-3	国際手数料	
	基本手数料 (最初の30枚まで) b1	46,000
12-4	30枚を越える用紙の枚数	0
12-5	用紙1枚の手数料 (X)	1,100
12-6	合計の手数料 b2	0
12-7	b1 + b2 = B	46,000
12-8	指定手数料	
	国際出願に含まれる指定国 数	7
12-9	Number of designation fees payable (maximum 8)	7
12-10	1指定当たりの手数料 (X)	9,900
12-11	合計の指定手数料 D	69,300
12-12	PCT-EASYによる料金の 減額 R	-14,200
12-13	国際手数料の合計 (B+D-R) I	⇒ 101,100
12-14	優先権証明書請求手数料	
	優先権証明書を請求した数	1
12-15	1優先権証明書当たり (X) の手数料	1,500
12-16	優先権証明書請求手数料 の合計 P	⇒ 1,500
12-17	納付すべき手数料の合計 (T+S+I+P)	⇒ 197,600
12-19	支払方法	送付手数料: 特許印紙 調査手数料: 特許印紙 国際手数料: 銀行口座への振込み 優先権証明書請求手数料: 特許印紙

EASYによるチェック結果と出願人による言及

13-1-1	出願人による言及 注釈	9109 弁理士 平木祐輔 9618 弁理士 石井貞次
--------	----------------	--------------------------------

PCT手数料計算用紙(願書付属書)

原本(出願用) - 印刷日時 2000年03月30日 (30.03.2000) 木曜日 16時11分46秒

13-2-2	EASYによるチェック結果 指定国	Green? より多くの指定が可能です。(以下の国が指定からはずされています: AP:(GH, GM, KE, LS, MW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW); EA:(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM); OA:(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG); AE, AG, AL, AM, AT, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CH, LI, CN, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, UZ, VN, YU, ZA, ZW) 確認してください。
13-2-3	EASYによるチェック結果 氏名(名称)	Green? 出願人 1: 英文表記での名称はできるだけ大文字で記入してください。
13-2-5	EASYによるチェック結果 生物	Green? 寄託された生物材料: PCT締約国によっては、寄託された生物材料の特徴に関する情報を出願時に明細書に記載することを義務づけている国がありますので、確認してください。
13-2-6	EASYによるチェック結果 内訳	Yellow! すべての出願人が願書に署名(記名押印)をしない限り、委任状又は包括委任状の写しを添付する必要があります。
		Green? 国際出願に図面が含まれていませんが、よろしいですか?
		Green? 寄託された生物材料: PCT締約国によっては、寄託された生物材料の特徴に関する情報を出願時に明細書に記載することを義務づけている国がありますので、確認してください。
13-2-9	EASYによるチェック結果 注釈	Yellow! 願書に表示しなければならない通常の項目はすべて他のPCT-EASYの機能で入力することができます。言及を用いた表示の有効性について確認してください。
13-2-10	EASYによるチェック結果 受理官庁/国際事務局記入欄	Green? この願書を作成したPCT-EASYは英語版ないし西欧言語版以外のWindows上で動作しています。ASCII文字以外の文字について、願書と電子データを注意して比較してください。

PCT

原本（出願用） - 印刷日時 2000年03月30日（30.03.2000）木曜日 16時11分46秒

0-1	様式-PCT/RO/134 (EASY) この寄託された微生物又はその他の生物材料に関する表示 (PCT規則13の2)は、 右記によって作成された。	PCT-EASY Version 2.90 (updated 08.03.2000)
0-1-1		
0-2	国際出願番号.	
0-3	出願人又は代理人の書類記号	PH-909-PCT
1	下記の表示は発明の詳細な説明中に記載された微生物又は生物材料に関連している。	
1-1	記載頁	8
1-2	行	27
1-3	寄託の表示	
1-3-1	寄託機関の名称	通商産業省・工業技術院生命工学技術研究所(NIBH)
1-3-2	寄託機関のあて名	日本国 〒305-0046 茨城県つくば市東1丁目1-3
1-3-3	寄託の日付	1999年05月21日 (21.05.1999)
1-3-4	受託番号	NIBH FERM BP-7106
1-4	追加の表示	なし (NONE)
1-5	この表示を行うための指定国	すべての指定国
1-6	追加事項の表示の届け出 右記の表示は後に国際事務局に届け出る予定である。	なし (NONE)

受理官庁記入欄

0-4	この用紙は国際出願とともに受理した (はい/いいえ)	
0-4-1	権限のある職員	

国際事務局記入欄

0-5	この用紙が国際事務局に受理された日	
0-5-1	権限のある職員	

優先権証明願 (P C T)

特許庁長官 近藤 隆彦 殿

1. 事件の表示

特願平 1 1 - 1 4 5 3 4 2 号

2. 請求人

識別番号 1 0 0 0 9 1 0 9 6

住 所 東京都港区虎ノ門一丁目 1 7 番 1 号
虎ノ門 5 森ビル 3 階

氏 名 弁理士 ^{ひら}平 ^き木 ^{ゆう}祐 ^{すけ}輔

電話番号 0 3 (3 5 0 3) 8 6 3 7

3. 出願国名 P C T

4. 証明に係る他の書類名

委 任 状

平成 12 年 3 月 17 日

私儀、

識別番号 100091096 弁理士 平木祐輔 氏、

識別番号 100096183 弁理士 石井貞次 氏、

をもって復代理人とし、下記の特許出願に関する書類の閲覧並びに優先権証明書の下附を受けるための一切の手続きをなすことを委任します。

記

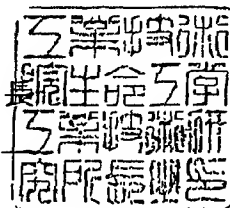
1. 特許出願

出願番号 平成 11 年 特許願 第 145342 号

住 所 茨城県つくば市東 1 丁目 1 番 3

氏 名 工業技術院 生命工学工業技術研究所長

大 箸 信





送付手数料・調査手数料 95,000 円

ご利用明細

ご来店いただき
ありがとうございます。

◎ 東京三菱銀行

年月日	取扱店番	お取引内容
120330	0428207	お振込み
受付通番	銀行番号	支店番号
0246		
口座番号		
お取扱金種		お取引金額
万円 10 0 千円 1 500円 1 100円 0 50円 0 10円 0 5円 0 1円 0		¥101,100*
お取扱い できない場合		残高
期日 12.22 振込手数料 ¥315* おつり ¥85*		
東京三菱銀行 内幸町支店 普通 0473286 WIPO-PCT GENEVA 様 ヒラキコクサイトツキヨシ"ムシヨ 様 03-3503-8637 振込予約(12.03.31 扱い)		

お振込・お取入
ご依頼人

基本手数料

46,000 円

指定手数料

69,300 円

PCT-EASY による料金の減額 —14,200 円

国際手数料の合計

101,100 円

様式

INTERNATIONAL FORM

BUDAPEST TREATY ON THE INTERNATIONAL
RECOGNITION OF THE DEPOSIT OF
MICROORGANISMS FOR THE PURPOSES OF
PATENT PROCEDURE

特許手続上の微生物の寄託の国際的承認
に関するブダペスト条約

RECEIPT IN THE CASE OF AN ORIGINAL
DEPOSIT

下記国際寄託当局によって規則 7. 1 に従い
発行される。

issued pursuant to Rule 7. 1 by the
INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY
identified at the bottom of this
Page.

原寄託についての受託証

氏名 (名称)

工業技術院生命工学工業技術研究所長
大箸 信一

寄託者

あて名 〒

茨城県つくば市東1丁目1番3

殿

1. 微生物の表示

(寄託者が付した鑑別のための表示)
P2K6

(受託番号)

FERM BP- 7106

2. 科学的性質及び分類学上の位置

1 欄の微生物には、次の事項を記載した文書が添付されていた。

- ☒ 科学的性質
☒ 分類学上の位置

3. 受領及び受託

本国際寄託当局は、平成 11 年 5 月 21 日 (原寄託日) に受領した 1 欄の微生物を受託する。

4. 移管請求の受領

本国際寄託当局は、平成 11 年 5 月 21 日 (原寄託日) に 1 欄の微生物を受領した。
そして、平成 12 年 3 月 28 日に原寄託よりブダペスト条約に基づく寄託への移管請求を受領した。
(平成 11 年 5 月 21 日に寄託された微工研函寄第 P- 17393 号より移管)

5. 国際寄託当局

通商産業省工業技術院生命工学工業技術研究所

名称: National Institute of Bioscience and Human-Technology
Agency for Industrial Science and Technology

所長

大箸 信一

Dr. Shinichi


Director-General

あて名: 日本国茨城県つくば市東1丁目1番3号 (郵便番号 305-8566)

1-3, Higashi 1 chome Tsukuba-shi Ibaraki-ken
305-8566, JAPAN

平成 12 年 (2000) 3 月 29 日

フレキシブルディスクの記録形式等の情報を記載した書面

1. 出願人氏名 (名称) 工業技術院長が代表する日本国
JAPAN as represented by SECRETARY OF AGENCY OF
INDUSTRIAL SCIENCE AND TECHNOLOGY
2. 代理人氏名 (名称) (9109) 弁理士 平木 祐輔 
HIRAKI Yusuke
3. 国際出願の表示 30.03.00 提出の国際出願
4. 発明の名称 新規低温細菌を検出するためのDNAプローブ
5. 使用した文字コード テキスト形式
6. 配列を記録したファイル名 配列表 (PH-909-PCT).TXT
7. 連絡先
 - ・電話番号 03 (3503) 8637
 - ・担当者氏名 平木 祐輔

陳述書

特許庁長官 近藤 隆彦 殿

本書に添付したフレキシブルディスクに記録した塩基配列またはアミノ酸配列は、明細書に記載した塩基配列またはアミノ酸配列を忠実にコード化したものであって、内容を変更したものでないことを陳述します。

平成12年3月30日

国際出願の表示 30.03.00提出の国際出願

発明の名称 新規低温細菌を検出するためのDNAプローブ

出願人（代理人）

氏 名 (9109) 弁理士 平 木 祐 輔



HIRAKI Yusuke

あて名 〒105-0001 日本国東京都港区虎ノ門1丁目17番1号
虎ノ門5森ビル 3F

Toranomon No.5 Mori Building Third Floor, 17-1,
Toranomon 1-chome, Minato-ku, Tokyo 105-0001 Japan

新規低温細菌を検出するためのDNAプローブ

5 技術分野

本発明は、深海微生物を指標とした深海水の循環やその湧昇のモニタリングの技術に関し、より詳細には、Psychrobacter pacificus、Psychrobacter glacincolaおよびこれらの近縁種からなる群より選択される細菌を種特異的に検出する技術に関する。

10 背景技術

日本近海の深海水は、グリーンランド沖で沈み込んだ密度の高い海水に端を発し、さらに南極海周辺での高密度海水の加入を経て日本海溝をはじめとする北太平洋海域へ流れ込む海洋大循環流により供給されていると推測されている。このような深海水は豊富な栄養塩類を含んでおり、湧昇海域では高い生物生産活動が

15 見られるため、これを利用した深海水の利用が現在検討されている。

また、これまで利用されていなかった深海魚が、食料、餌料として用いられはじめている。

さらに、地球規模や地域規模での環境汚染問題に関連し、人間活動の結果放出または廃棄される二酸化炭素や放射性廃棄物、産業廃棄物等を日本近海の深海域
20 に投棄することが検討されている。

しかし、これら深海水や深海域に関する知見が不足しているため、深海水が表層の生物活動に及ぼす影響の評価や二酸化炭素や放射性廃棄物、産業廃棄物等の深海投棄が深海の生物活動に及ぼす影響の評価が困難な状況にある。また、グローバルな深層海水の循環を知る上で有用な指標生物の報告もない。

25 発明の開示

本発明は、深海水や深海域を人為的に利用するにあたって生物学的な安全性評価を行う技術、具体的には、深海に固有に生息する微生物種の遺伝情報の特徴に基づき、該微生物およびその近縁種を種特異的に検出する技術の提供を目的とする。

本発明者らは、日本海溝深海水由来の新規低温細菌種の16S rRNA遺伝子の塩基配列情報に基づき、本微生物を分子・細胞レベルにおいて特異的に検出することを可能にするオリゴヌクレオチドプローブを開発して、本発明を完成させるに至った。

5 すなわち、本発明は、配列番号1の塩基配列を有する16S rDNAを提供する。

また、本発明は、配列番号1の塩基配列の一部を含むオリゴヌクレオチドプローブを提供する。オリゴヌクレオチドプローブはRNAプローブまたはDNAプローブのいずれであってもよい。配列番号1の塩基配列の一部としては配列番号2の塩基配列を挙げることができる。上記のプローブは、Psychrobacter pacificus、Psychrobacter glacincolaおよびこれらの近縁種からなる群より選択される細菌を検出または同定するために使用することができる。

さらに、本発明は、配列番号1の塩基配列の一部を含むオリゴヌクレオチドプローブを用いて、Psychrobacter pacificus、Psychrobacter glacincolaおよびこれらの近縁種からなる群より選択される細菌を検出または同定する方法を提供する。

また、本発明は、好気性、グラム陰性、非運動性、無色、非孢子形成性、およびオキシダーゼ陽性であることを特徴とするPsychrobacter pacificusも提供する。

本明細書は、本願において主張する優先権の基礎である日本国特許出願第11-145342号の明細書及び／又は図面に記載される内容を包含する。

配列表の説明

配列番号2は、プローブ配列Psypac469-487の塩基配列を示す。

配列番号3は、プライマー359fの塩基配列を示す。

配列番号4は、プライマー803rの塩基配列を示す。

25 配列番号5は、プライマー821fの塩基配列を示す。

配列番号6は、プライマー1104rの塩基配列を示す。

配列番号7は、プライマー1111fの塩基配列を示す。

配列番号8は、プローブEub338-355の塩基配列を示す。

配列番号9は、プローブContの塩基配列を示す。

発明を実施するための最良の形態

本発明の新種の微生物、Psychrobacter pacificusは、八丈島沖の日本海溝水深 6,000mの海水より、1気圧摂氏4度の低温培養条件下で優占的に出現した従属栄養性微生物である。Psychrobacter pacificusとしては、NIBH P2J2、NIBH
5 P2J3、NIBH P2J13、NIBH P2K6、NIBH P2K17およびNIBH P2K18の6種の株が本発明者らにより単離されている。これらのうち、NIBH P2J3、NIBH P2K6およびNIBH P2K18の分類学的性質を以下の表1、2および3にまとめる。なお、表1、2および3には、同時に単離された他の菌株や本菌の近縁種についても分類学的性質が記載されている。

10

(以下余白)

表 1

日本海溝表層海水および深海水由来の低温細菌の運動性および細胞外器

Strain	Motility test ¹ (microscopic)	Motility test ² (agar plate)	Extracellular organ ³	Phylogenetic location
Surface seawater				
P1H8	-	-	Flagella*	Halomonadaceae
P1H13	-	-	None	Halomonadaceae
P1H14	-	-	None	Halomonadaceae
P1H22	+	+	Flagella	Halomonadaceae
P1H25	+	+	Flagella	Halomonadaceae
Deep seawater				
P2J2	-/w	-	Fimbriae	Moraxellaceae
P2J3	-/w	-	Fimbriae	Moraxellaceae
P2J13	-/w	-	Fimbriae	Moraxellaceae
P2K6	-/w	-	Fimbriae	Moraxellaceae
P2K17	-/w	-	Fimbriae	Moraxellaceae
P2K18	-/w	-	Fimbriae	Moraxellaceae

1 : ノマルスキー光学系を用いた光学顕微鏡下。2 : 栄養素勾配を有する半固形寒天培地上。3 : 電子顕微鏡観察による。- : 陰性。Flagella* : 鞭毛付着が時折観察された。w:弱い、びくつとした動き。

サイクロバクター・パシフィクスおよび近縁種の表現型の特徴とGC含量

表 2

Characteristics ^a	Psychrobacter pacificus					Summary	Psychrobacter					Psychrobacter <i>glaciacola</i> ACAM 483 ^c
	NIBH strain no.						<i>immobilis</i> ^b (Phenon 1)					
	P2/3	P2K6	P2K18	P2K18	P2K18		<i>urathiorans</i> ^b (Phenon 2)	<i>frigidicola</i> ^b (Phenon 3)	<i>phenylpyruvicus</i> ACAM 535 ^b			
Urease activity	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Phenylalanine deaminase	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Tryptophan deaminase	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Nitrate reduction	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Growth in NaCl (%):												
0	w	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+
1	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+
3	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
5	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
8	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+
Growth at (°C):												
30	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
35	+	w	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
40	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Acid production from:												
Glucose	+	w	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Xylose	+	w	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Arabinose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
*Others ^d	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
PNPG test ^d	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Use as sole carbon and energy sources:												
Acetate	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+
L-alanine	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+
p-hydroxy-benzoate	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
3-hydroxy-butyrate	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Citrate	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Gluconate ^d	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
L-histidine	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Lactate	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
DL-malate ^d	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Malonate	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
Propionate	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+
L-serine	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+
Suberate	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
n-valerate	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+
**Others	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
DNA G+C content (mol %)	44	44	44	45	44-45	44-47	44-46	41-42	43	43-44	43-44	43-44

a) 全ての種および菌株は、オキシダーゼ、カタラーゼ、4～15℃における増殖、6.5% NaClに対する耐性、ならびに唯一の炭素およびエネルギー源としてのL-プロリンの利用について陽性であった。b) Bowman et al., (1996) Int. J. Syst. Bacteriol. 46:841-848のデータ。c) Bowman et al., (1997) System.

5 Appl. Microbiol. 20:209-215のデータ。d) API 20 NEテストによって決定した。化合物の利用性はAPI ID 32 GNテストを用いて推定した。PNPGテスト: パラ-ニトロフェニル-(β)-D-ガラクトピラノシドを用いた β -ガラクトシダーゼについてのテスト。

*その他: グルコース発酵、インドール産生、エスクリンの加水分解、ゼラチンの加水分解、およびアルギニンジヒドロラーゼ。^a

10 **その他: N-アセチル-D-グルコサミン、m-ヒドロキシ-ベンゾエート、グリコーゲン、酢酸フェニル。以下の炭素およびエネルギー源は、いずれの種または菌株によっても利用されなかった: N-アセチルグルコサミン、アジピン酸、L-アラビノース、カプリン酸、L-フコース、2-ケト-グルコネート、5-ケト-グルコネート、
15 (D)グルコース、(ミオ)イノシトール、イタコン酸、マルトース、D-マンニトール、D-メリビオース、(L)ラムノース、D-リボース、(D)サリシン、D-ソルビトール、スクロース。なお()はBowmanら(1996)が用いた基質の型を示す。表中の利用の記載において、()は光学異性体の型を示す。表中のサイクロバクター・パシフィクス
20 の欄における陽性菌株の頻度: +, 100%; +v, 67%; -v, 33%; -, 0%。他のサイクロバクター種の欄における陽性菌株の頻度: +, 100-90%; v+, 89-11%; v-, 10-0%。w: 弱い反応。

NIBH P2K6菌株は、サイクロバクター・パシフィクスの基準株であると規定された。

表3 サイクロバクター・パシフィクス[®]の脂肪酸組成および主要キノン型

Composition	<i>Psychrobacter pacificus</i>			Average content	<i>Psychrobacter</i>
	NIBH strain no.				<i>immobilis</i>
	P2J3	P2K6*	P2K18		ATCC 43116
Fatty acid:					
10:0	1.3	Tr	1.2	0.8 (0.7)	0.9
11:0	0.1	Tr	0.2	0.1 (0.1)	Tr
12:0	2.2	0.8	2.3	1.8 (0.8)	Tr
14:0	0.7	0.6	0.5	0.6 (0.1)	0.3
14:1 (X1)	0.1	0.2	Tr	0.1 (0.1)	0.1
15:0	0.4	Tr	0.4	0.3 (0.2)	0.2
16:0	7.3	8.7	6.5	7.5 (1.1)	4.3
16:1 (w7c)	9.7	15.8	6.6	10.7 (4.7)	3.8
16:1 (X2)	0.4	0.4	0.3	0.4 (0.1)	0.4
17:0	2.7	5.6	4.8	4.4 (1.5)	4.2
i17:0	0.6	Tr	0.4	0.3 (0.3)	Tr
17:1 (X3)	5.1	1.5	5.1	3.9 (2.1)	6.8
18:0	9.4	5.6	13.1	9.4 (3.8)	8.0
18:1 (w7c)	1.2	0.8	0.7	0.9 (0.3)	0.8
18:1 (w9c)	50.1	52.8	50.9	51.3 (1.4)	63.1
18:2	3.4	2.4	1.8	2.5 (0.8)	3.5
19:0	0.4	0.4	0.6	0.5 (0.1)	0.9
20:0	Tr	Tr	Tr	Tr	0.1
Total	95.1	95.6	95.4	95.5	97.4
Total unsaturated	70.0	73.9	65.4	69.8	75.0
Hydroxy fatty acid:					
3-OH 12:0	4.1	3.6	3.9	3.9 (0.3)	2.2
3-OH 14:0	0.8	0.8	0.7	0.8 (0.1)	0.4
Total	4.9	4.4	4.6	4.6 (0.3)	2.6
Major quinone type	Q-8	Q-8	Q-8	Q-8	Q-8

X1-3: 正確な二重結合の位置は決定されていない。Tr: ごく微量(<0.1%)。

カッコ内の数字は標準偏差を示す(n=3)。*: 基準株。

- Psychrobacter pacificusは、好気性、グラム陰性、非運動性、無色、非孢子形成性、オキシダーゼ陽性の長さ1.0-1.5 μm 、幅約 1 μm の球桿菌である。これらの菌株は細胞外器官として多数のフィムブリエ（繊毛）を生ずるが、鞭毛は生じない。ポリペプトンおよび酵母抽出物を含む寒天プレート上に、縁が欠けていない円形で凸状の、色がオフホワイトのコロニーを形成する。蛍光色素は全く形成されない。至適増殖には海水または約 3 %のNaClを必要とするが、殆どの菌株はNaCl濃度が 0 または 8 %以上の場合は増殖しない。4 $^{\circ}\text{C}$ では定常期に達するのに 1 ~ 2 週間を要するが、これらの菌株は 4 $^{\circ}\text{C}$ で20 $^{\circ}\text{C}$ における増殖収率(growth yield)に匹敵する増殖収率を示す。約25 $^{\circ}\text{C}$ で至適増殖が起こり、限界増殖温度は38 $^{\circ}\text{C}$ である。グルコース、キシロースおよびアラビノースから酸が好氣的に形成される。これらの菌株はウレアーゼ活性が陽性であるが、フェニルアラニンデアミナーゼおよびトリプトファンデアミナーゼについては陰性である。この種はグルコース発酵、インドール産生、エスクリン加水分解、ゼラチン加水分解およびアルギニンジヒドロラーゼという生化学試験について陰性である。この種は唯一の炭素およびエネルギー源としてL-ヒスチジンおよびDL-リンゴ酸を利用する。いくつかの菌株は酢酸、L-アラニン、3-ヒドロキシ-ブチレート、乳酸、マロン酸およびスベリン酸を利用するが、p-ヒドロキシ-ベンゾエート、クエン酸、グルコン酸、プロピオン酸、L-セリンまたはn-吉草酸を利用する菌株はない。18:1w9cが主要な脂肪酸であり、またQ 8が主要なキノンである。DNA G+C含有量は、HPLCで測定すると43~44モル%である。基準株は、日本国八丈島沖日本海溝の深度6,000 mの海水から 4 $^{\circ}\text{C}$ で単離したNIBH P2K6である。この菌株は、財団法人醗酵研究所に寄託されている (IFO 16270)。また、Psychrobacter pacificus NIBH P2K6 (IFO 16270) は工業技術院生命工学工業技術研究所（日本国茨城県つくば市東 1 丁目 1 番 3 号）に平成 11 年 5 月 21 日付けで寄託された（受託番号：FERM BP-7106）。

Psychrobacter pacificusは新種であり、その近縁種は南極域で多数分離されている (Bowman et al., (1996) Int. J. Syst. Bacteriol. 46:841-848, Bowman

n et al., (1997) System. Appl. Microbiol. 20:209-215) ことから、グローバルな深層海水の循環に関連した指標生物として有用であることがわかる。グローバルな深層海水の循環については、太平洋海域では定常的に南極から日本海溝に向け深層海水が流れていることが知られている(Stommel, H.(1958) Deep-Sea Res. 5:80-82)。

配列番号 1 の塩基配列を有する 16S rDNA は、Psychrobacter pacificus NIBH P2K6 から得られる。すなわち、Psychrobacter pacificus NIBH P2K6 の菌体から標準的な方法によりゲノム DNA を抽出し、適切なプライマーを用いて 16S rDNA を PCR により増幅する (Lane, D.L. (1991) 16S/23S rRNA sequencing.

10 In Nucleic Acid Techniques in Bacterial Systematics, pp.115-175. Edited by E. Stackebrandt, M. Goodfellow. West Sussex: John Wiley & Sons). PCR 産物から過剰なプライマーおよび dNTP を除去した後、適切なプライマーを用いるサイクルシーケンス法により、精製 PCR 産物の配列を直接決定することができる。その配列を配列番号 1 に示す。

15 Psychrobacter pacificus NIBH P2K6 の 16S rRNA 遺伝子の塩基配列情報に基づき、本菌に特異的な塩基配列領域を抽出し、分子・細胞レベルでの検出を可能にする DNA プローブを作製する。本菌に特異的な塩基配列領域としては、配列番号 1 の塩基配列の塩基番号 458~476 の領域 (大腸菌の配列に準じた場合は、塩基番号 469~487 の領域) などを挙げるができる。この領域に対応する塩基長 10~50 bp、好ましくは塩基長 15~25 bp のプローブを作製するとよい。好ましい一例として、以下の塩基配列を有するプローブを挙げるができる。

・ 5'TAATGTCATCGTCCCCGGG3' (配列番号 2)

25 プローブは、ホスホルアミド法 (Beacage and Carruthers, Tetrahedron Lett. 22:1859-1862 (1981)) またはトリエステル法 (Matteucci et al., J. Am. Chem. Soc. 103:3185 (1981)) により合成することができる。あるいは、自動合成装置を使用してプローブを合成してもよい。

さらに、プローブは、アイソトープ、蛍光色素、DIG (ジゴキシゲニン) など で標識するとよい。標識としては、Cy5 (インドジカルボシアニン) や TRITC (テトラメチルローダミンイソチオシアネート)、FITC (フルオレセイン)

ンイソチオシアネート)等の蛍光色素やDIG(ジゴキシゲニン)等のハプテンを挙げる事ができる。

- 本発明のプロープを用いて、種々のハイブリダイゼーション法(サザンブロット法、ノーザンブロット法、コロニーハイブリダイゼーション、in situハイブリダイゼーション(例えば、FISH)など)により、Psychrobacter pacificus、Psychrobacter glacincolaおよびこれらの近縁種を検出または同定することができる。Psychrobacter pacificusおよびPsychrobacter glacincolaの近縁種としては、データベース上に記載されているが同定根拠が不明なPsychrobacter glacincola(AFO25555、PGU85879、PGU85878、PGU85877、PGU85876)、Psychrobacter immobilis(PIU85880)、Psychrobacter sp.(PSU85874)等の菌株を挙げる事ができる。

配列番号2の塩基配列のプロープを用いて、Psychrobacter pacificusを検出または同定する方法の一例について、以下に説明する。

- パラフォルムアルデヒド等を用いて固定した微生物試料を、ゼラチン等有機被膜を形成させたスライドグラス上に塗抹し、微生物細胞をスライドグラスの有機被膜上に不動化する。エタノールで脱水、または微生物細胞を室温で一晩程乾燥させた後、微生物のゲノムDNAおよびRNAと該DNAプロープとの間でハイブリダイゼーションを行い、洗浄処理により遊離または不完全結合DNAプロープを除去する。通常の蛍光顕微鏡観察手法に準じて微生物細胞を観察し、対象とする微生物細胞に相補結合した蛍光標識DNAプロープの蛍光を検出する。コントロールとして、非特異的なDNAプロープや対象とする微生物属種外の微生物を用い、上記実験を行う。対象とした微生物がDNAプロープで標的とした微生物であった場合は、細胞内核酸と該DNAプロープとの相補結合により細胞全体が蛍光を発するので検出、同定ができる。

- 本発明のプロープは、Psychrobacter pacificus、Psychrobacter glacincolaおよびこれらの近縁種の種特異的な検出を可能にするばかりでなく、検出の迅速化と精度向上をもたらす点でも非常に有益である。

本発明を以下の実施例により具体的に説明する。これらの実施例は説明のためのものであって、本発明の範囲を限定するものではない。

実施例 1

Psychrobacter pacificus 菌株の単離と 16S rRNA 遺伝子の配列決定

日本海溝の表層および深海環境から単離した67菌株より全部で16菌株を選別した。このうち、11菌株をモラキセラ菌に類似した細菌であると仮に同定した。

- 5 異なる寒天培地、例えばポリペプトンおよび酵母抽出物を含有する人工海水に基づく 1/2 TZ (Maruyama, A et al., (1993) J. Oceanogr. 49, 353-367)、Marine Agar (Difco; Detroit, MI, USA) および Nitrient Agar (Difco) 等を用いてこれらの菌株を純化した。各菌株を 20℃ でインキュベートして集菌し、ゲノム DNA を得た。0.3% の寒天を含む 1/2 TZ 半固形寒天培地を 4℃ で保存のために
- 10 に用いた。ガラス試験管に封入した乾燥菌体もまた長期保存のために 4℃ で保存した。

- 深海水から単離したモラキセラ菌に類似した菌株について、下記の直接配列決定によって 16S rRNA 遺伝子を決定した。すなわち、菌体を遠心により集菌し、洗浄し、そして TE 緩衝液 (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA; pH 8.0) に再懸濁した。セチルトリメチルアンモニウムブロミド (CTAB)、フェノール、およびクロロホルム/イソアミルアルコール (Murray, M.G. et al., (1980) Nucleic Acids Res 8, 4321-4325) を用いて標準的方法によってゲノム DNA を抽出した。ほぼ完全な 16S rRNA 遺伝子を得るため、プライマー 27f および 1525r (Lane, D.L. (1991) 16S/23S rRNA sequencing. In Nucleic Acid Techniques in
- 15 Bacterial Systematics, pp.115-175. Edited by E. Stackebrandt, M. Goodfellow. West Sussex: John Wiley & Sons) ならびに文献 (Maruyama, A. et al., (1997) Mar. Biol 128, 705-711) に記載の PCR サイクルを用いて、Gene Amp PCR 9600 (Perkin-Elmer, Norwalk, Conn., USA) によって PCR を実施した。SUPREC-02 (宝酒造) を用いて PCR 産物から過剰なプライマーおよび dNTP
- 20 を除去した。自動 DNA シークエンサー (ALFred; Pharmacia LKB, Sweden) を用いて、適切なフォワードおよびリバースプライマー (Lane, D.L. (1991), 上記) を用いて、製造者の指示に従って、サイクルシークエンス法により精製 PCR 産物を直接配列決定した。具体的には、上記プライマーは大腸菌番号系における 342r、359f (5'-TCC TAC GGG AGG CAG CAG TG (配列番号 3) ; 20量

体)、519r、803r (5'-CAT CGT TTA CGG CGT GGA C (配列番号 4) ; 19
量体)、821f (5'-GTC CAC GCC GTA AAC GAT G (配列番号 5) ; 19量体
)、1104r (5'-TTG CGC TCG TTG CGG GAC (配列番号 6) ; 18量体)、お
よび1111f (5'-GTC CCG CAA CGA GCG CAA (配列番号 7) ; 18量体)であ
5 る。各16S rDNA領域断片の配列を両方の鎖について決定し、GENETYX ソフ
トウェア (バージョン 8 ; ソフトウェア開発株式会社) を用いて連結した。モラ
キセラ菌に類似した深海の菌株を除いて、標準種モラキセラ・ラクナータ菌 (*M
oraxella lacunata*) ATCC 17967を含む他の細菌の16S rDNAを以前に記述され
た (Maruyama, A. et al., (1997)上記) ように抽出し、増幅し、サブクローン
10 化した。CLUSTAL W (バージョン1.71; 44) 中の多重アラインメントプログ
ラムを用いて配列を並べた。CLUSTAL W プロファイルアラインメントオブシ
ョンを用いて、我々が決定した配列をアントワープ大学 (University of Antwer
p) の rRNA wwwサーバー ([http://rrna,uia,ac,be/](http://rrna.uia.ac.be/); 45) から得た公知の並置させた配
列に合わせた。この並置したデータマトリックスから、空隙 (gap) があるすべて
15 の位置、すなわち未決定および曖昧な配列を除去した。*Psychrobacter pacificu
s* NIBH P2K6 の 16S rRNA 遺伝子の配列を配列番号 1 に示す。

実施例 2

作製プローブのデータベース検索結果

配列中 2 つまでのミスマッチを許す条件で、配列番号 2 の塩基配列をプローブ
20 配列 (「Psypac469-487」と命名する。) として RDP - DB (データベース)
を検索したところ、Psypac469-487 と一致するものは、*Psychrobacter glacincol
a* (Pinhassら) (ミスマッチ 0)、*Psychrobacter* sp., *P. immobilis* および 4 種の *P.
glacincola* 関連株 (Bowmannら, Appl. Environ. Microbiol. 63, 3068-3078, 199
7) (ミスマッチ 1)、*Psychrobacter* sp., *Psychrobacter* sp. Ant9 および *Mor
25 axella* sp. Ant7 (Pinhassら) (ミスマッチ 2) であった。このことは、Psyp
ac469-487 が *Psychrobacter pacificus* の他に、*Psychrobacter glacincola* 類縁菌
株およびこれらの近縁種を特異的に検出可能であることを示している。

以上の結果は、作製プローブの塩基配列が、既存菌株を網羅する DNA データ
ベース上で *Psychrobacter pacificus*, *Psychrobacter glacincola* およびこれらの

近縁種に相補性を示すのみで、本プローブが本二種の種特異的検出に極めて有効であることを示す。

実施例 3

作製プローブのハイブリダイゼーション試験結果

5 (1) 微生物試料の調整

用いた微生物試料の属種株名は、表4に示した。この中で、Psychrobacter pacificus 菌株は、八丈島沖日本海溝の 6000 m 深海水試料より 4℃で培養可能な微生物として分離されたもので、表層海水中には全く見出されなかった (Maruyama et al. Marine Biology 128, 705-711, 1997)。Bacillus marinus は Marine Broth (Difco) を用いて好気条件下 20℃で、Psychrobacter phenylpyruvicus は ATCC Culture Medium 4番を用いて好気条件下 30℃で、培養した。これ以外の細菌は、1/2TZ 液体培地 (Maruyama et al., J. Oceanogr. 49, 353-367, 1993)を用いて好気条件下 10~20℃で培養した。

15 培養された微生物は、最終濃度 3% のパラフォルムアルデヒドを用いて 4℃で一晩固定された。パラフォルムアルデヒドは、3xPBS (Phosphate Buffer Saline: NaCl: 24g、KCl: 0.6g、Na₂HPO₄: 0.72g、pH 7.4) 中に 15% となるように予め溶解しておき、試料: パラフォルムアルデヒド = 4:1 で混合して使用した。

(2) 試料の DNA プローブによる染色

20 この固定した微生物細胞を、あらかじめゼラチンを塗布した直径 11 mm の穴の開いたテフロンコートスライド上に吸着させ、エタノール脱水、または室温で一晩乾燥させた。その後、試料穴中にハイブリダイゼーション溶液 (NaCl: 0.9M、リン酸ナトリウム緩衝液 (pH 7.0): 50mM、EDTA: 5mM、SDS: 0.5%、Denhardt solution: final x10, Poly (A): 1.0mg/ml) を 50μl 添加した。上記のように調整したスライドガラスを、乾燥を防ぐために少量の 3xPBS を加えた 50ml コニカルチューブ内に静置し、42℃前後でプレハイブリダイゼーションを 30 分間行った。

5' 末を Cy 5, TRITC (テトラメチルローダミンイソチオシアネート)

またはF I T C (フルオレセインイソチオシアネート) でラベル化した蛍光標識オリゴヌクレオチドDNAプローブを作成し、上記ハイブリダイゼーション溶液にそれぞれのプローブを1 ng/μlとなるように添加した。各々のオリゴヌクレオチドDNAプローブの最適温度で4時間半ハイブリダイゼーションを行った。

- 5 未反応のオリゴヌクレオチドプローブDNAを除去するために、各々のオリゴヌクレオチドDNAプローブの適温で洗浄溶液 (NaCl : 0.9 M, リン酸ナトリウム : 0.5 mM, SDS : 0.1 %, pH = 7.0) 中にスライドグラスを入れ、30分間洗浄した。

用いたオリゴヌクレオチドDNAプローブとしては、該 Psypac469-487の他、
10 ドメイン Bacteria (旧称 Eubacteria) の共通プローブである Eub338-355 (5'-GCTGCCTCCCGTAGGAGT (配列番号8)) やコントロール用の Cont (5'-GTGCCAGCAGCCGCGG (配列番号9)) を用いた。

(3) 試料のDNA染色

- 15 ハイブリダイゼーション終了後、スライドグラスに終濃度5 μg/mlのDAPI溶液を加え、室温で10分間反応させ、微生物細胞内に存在するDNAの染色を行った。反応終了後、純水中にスライドグラスを浸し、15分間洗浄した後、室温で乾燥した。

(4) 試料の蛍光顕微鏡観察

- 20 乾燥させたスライドグラスの微生物試料上にDABCO (ジアゾビスクロオプタン) 溶液 (1 g/100 ml (10 ml PBS+90 ml Glycerol)) 等の退色防止剤を加え、カバーグラスを載せ、油浸条件下で蛍光顕微鏡による観察を行った。必要に応じ、蛍光顕微鏡に取り付けた冷却CCDカメラで各々の色素に対する蛍光画像を取得し、画像を解析した。結果を表4に示す。

表 4

FISH法による蛍光顕微鏡下でのプローブ有効性試験の結果

使用菌株	蛍光標識 DNA プローブ			
	Control	Psypac 469-487	Euba 338-355	DAPI染色
<i>Psychrobacter pacificus</i> NIBH P2J2	×	○	○	○
<i>P. pacificus</i> NIBH P2J3	×	○	○	○
<i>P. pacificus</i> NIBH P2J13	×	○	○	○
<i>P. pacificus</i> NIBH P2K6 (=IFO 16270)	×	○	○	○
<i>P. pacificus</i> NIBH P2K18	×	○	○	○
<i>Psychrobacter glacincola</i> ACAM 483*	×	○	○	○
<i>Psychrobacter frigidicola</i> ACAM 304	×	×	○	○
<i>Psychrobacter immobilis</i> ATCC 43116	×	×	○	○
<i>Psychrobacter urativorans</i> ATCC 15174	×	×	○	○
<i>Psychrobacter phenylpyruvicus</i> ATCC 23333	×	×	○	○
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> IFO 12689	×	×	○	○
<i>Vibrio parahaemolyticus</i> IFO 12711	×	×	○	○
<i>Bacillus marinus</i> ATCC 29841	×	×	○	○

* : DNA データベース上では、*P. endoglaecicola* として登録された。

以上の結果は、in situハイブリダイゼーションにより、実際に作製プローブがPsychrobacter pacificusおよびPsychrobacter glacincolaの菌株に特異的に結合し、他の属種の菌株とは結合しないことを示す。

- 5 本明細書で引用した全ての刊行物、特許及び特許出願は、参照によりその全体を本明細書に組み入れるものとする。

産業上の利用の可能性

本発明のオリゴヌクレオチドプローブにより、深層海水の循環を知る上で有用な指標生物としてのPsychrobacter pacificusを分子・細胞レベルで高感度、高精度に検出できる。深層海水の挙動解析やその影響評価のためには多数の微生物試料を扱う必要があるため、従来の培養法では洋上での煩雑な分離・培養操作および陸上での分類・同定作業に多大な労力と時間が必要であったが、既存のデータベースでその種特異性が確認された塩基配列からなる本発明のDNAプローブを用いることにより、Psychrobacter pacificus、Psychrobacter glacincolaおよびこれらの近縁種の検出や同定の迅速化、省力化を図ることができる。

請求の範囲

1. 配列番号 1 の塩基配列を有する 16S rDNA。
2. 配列番号 1 の塩基配列の一部を含むオリゴヌクレオチドプローブ。
- 5 3. 配列番号 1 の塩基配列の一部が配列番号 2 の塩基配列である請求項 2 記載のプローブ。
4. Psychrobacter pacificus、Psychrobacter glacincolaおよびこれらの近縁種からなる群より選択される細菌を検出または同定するための請求項 2 または 3 記載のプローブ。
- 10 5. 配列番号 1 の塩基配列の一部を含むオリゴヌクレオチドプローブを用いて、Psychrobacter pacificus、Psychrobacter glacincolaおよびこれらの近縁種からなる群より選択される細菌を検出または同定する方法。
6. 好気性、グラム陰性、非運動性、無色、非孢子形成性、およびオキシダーゼ陽性であることを特徴とする Psychrobacter pacificus。

要 約 書

本発明は、深海に固有に生息する微生物種の遺伝情報の特徴に基づき、該微生物およびその近縁種を種特異的に検出する技術の提供を目的とする。本発明は、

- 5 配列番号 1 の塩基配列を有する 16S rDNA。配列番号 1 の塩基配列の一部を含むオリゴヌクレオチドプローブ、ならびに該プローブを用いて、Psychrobacter pacificus、Psychrobacter glacincola およびこれらの近縁種からなる群より選択される細菌を検出または同定する方法を提供する。本発明のオリゴヌクレオチド
- 10 cter pacificus を分子・細胞レベルで高感度、高精度に検出できる。

SEQUENCE LISTING

<110> Secretary of Agency of Industrial Science and Technology

<120> DNA probes for detecting novel psychrotrophic bacteria

<130> PH-909-PCT

<150> JP 11-145342

<151> 1999-05-25

<160> 9

<170> PatentIn Ver. 2.0

<210> 1

<211> 1526

<212> DNA

<213> *Psychrobacter pacificus*

<220>

<221> rRNA

<222> (1)..(1526)

<400> 1

tttgatcatg gctccagatt gaacgactgg gcggcaggct taacacatgc aagtcgagcg 60
gaaacgatga tagcttgcta ttaggcgtcg agcngccgga cgggtgagta atacttagga 120
atctacctag tagtggggga tagctcgggg aaactcgaat taataccgca tacgtctacg 180
ggagaaagca ggggntcatt agaccttgcg ctattagatg agcctaagtc ggattagcta 240

gatggtgggg taaaggccta ccatggcgac gatctgtagc tggcttgaga g gatgatcag 300
ccacaccggg actgagacac ggcccgact ctacgggagg cagcagtggg gaatattgga 360
caatggnggg aacctgac cagccatgcc gcgtgtgtga agaaggcctt ttggttgtaa 420
agcactttaa gcagtgaaga agactcttcg gttaatccc ggggacgatg acattagctg 480
cagaataagc accggctaac tctgtgccag cagccgcggt aatacagagg gtgcaagcgt 540
taatcggaat tactgggcgt aaagcgagcg taggtggctt gataagtcag atgtgaaatc 600
cccgggctta acctgggaac tgcacttgaa actgttaggc tagagtaggt gagagggaag 660
tagaatttca ggtgtagcgg tgaaatgcgt agagatctga aggaataccg atggcgaagg 720
cagcttcctg gcatcact gacactgagg ctgaaagcg tgggtagcaa acaggattag 780
ataccctggt agtccacgcc gtaaacgatg tctactagtc gttgggtccc ttgaggactt 840
agtgcgcag ctaacgcaat aagtagaccg cctggggagt acggccgcaa ggttaaaact 900
caaatgaatt gacgggggcc cgcacaagcg gtggagcatg tggtttaatt cgatgcaacg 960
cgaagaacct tacctggtct tgacatacac agaactctgt agagatacga gactgccttc 1020
gggaattgtg atacaggtgc tgcattgctg tcgtcagctc gtgtcgtgag atgttgggtt 1080
aagtcgccga acgagcgcaa ccctgtcct tagttaccag cacttcgggt gggaactcta 1140
aggatactgc cagtgacaaa ctggaggaag gcggggacga cgtcaagtca tcatggccct 1200
tacgaccagg gctacacacg tgctacaatg gtaggtacag agggcagcta cacagcgatg 1260
tgatgcgaat etcaaaaage ctatcgtagt ccagattgga gtctgcaact cgactccatg 1320
aagtaggaat cgctagtaat cgcggatcag aatgccgcgg tgaatacgtt cccgggcctt 1380
gtacacaccg cccgtcacac catgggagtt gattgcacca gaagtggta gcctaactta 1440
gtgagggcga tcaccacggt gtggtcgatg actgggggtga agtcgtaaca aggtagccgt 1500
aggggaacct gcggctggat cacctc 1526

<210> 2

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Synthetic DNA

<400> 2

taatgtcatc gtccccggg

19

<210> 3

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Synthetic DNA

<400> 3

tcctacggga ggcagcagtg

20

<210> 4

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Synthetic DNA

<400> 4

catcgtttac ggcgtggac

19

<210> 5

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Synthetic DNA

<400> 5

gtccacgccg taaacgatg

19

<210> 6

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Synthetic DNA

<400> 6

ttgcgctcgt tgcgggac

18

<210> 7

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Synthetic DNA

<400> 7

gtcccgcaac gagcgcaa

18

<210> 8

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Synthetic DNA

<400> 8

gctgcctccc gtaggagt

18

<210> 9

<211> 16

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Synthetic DNA

<400> 9

gtgccagcag ccgcgg

16